

1P-025 酵母 *rrn10* 遺伝子破壊抑圧変異株における rDNA 領域の重複による RNA 量の増加

Khatun Fahmida, ○笹野 佑, 杉山 峰崇, 原島 俊
(阪大院・工・生命先端・生工)
harashima@bio.eng.osaka-u.ac.jp

酵母 RNA は核酸調味料の原料として広く用いられており、産業上有用な生体物質の一つである。出芽酵母の全 RNA のうち約 80% をリボソーム RNA (rRNA) が占めることから、rRNA 含量を高めた出芽酵母を育種することが RNA 高生産酵母の育種に有効な戦略であると考えられる。rRNA 遺伝子は 12 番染色体上に約 150 コピー存在している。rRNA の転写に関与する Pol I 複合体のコンポーネントの一つである Rrn10 は、rRNA の高効率な転写に必要な因子であり、これをコードする遺伝子 *RRN10* は Pol I 複合体における唯一の非必須遺伝子である。我々は以前、*rrn10* 遺伝子破壊の抑圧変異株 (SupE) を取得した。SupE 株では *rrn10* 遺伝子破壊による rRNA の転写欠損が野生株と同程度まで回復していた。一方、我々は酵母染色体を任意の位置で分断することの出来る技術である PCS 法を開発している。本研究では PCS 法を適用して rDNA 領域のみを含む人工染色体を作製し、さらに交雑により、12 番染色体に存在する rDNA 領域に加えてもう一つの rDNA 領域を人工染色体上に保持する SupE-2X 株を構築した。SupE-2X 株は SupE 株と比較して RNA 含量が約 61%、SupE-2X 株と同様の方法で rDNA 領域を重複させた野生型株よりも約 41% 高かった。さらに、リボソームのラージサブユニットをコードしている *RPL40A* 遺伝子を過剰発現させたところ、SupE-2X 株よりもさらに約 47% の RNA 含量の増加が見られた。本結果から、rRNA 高含有酵母の育種には rDNA 領域の重複が有効な方法であり、そのためには *SUPE* 変異が必要であることが示された。

Increase of rRNA content in suppressor of *rrn10* gene disruptant in *Saccharomyces cerevisiae* by duplication of rDNA cluster

Fahmida Khatun, ○Yu Sasano, Minetaka Sugiyama, Satoshi Harashima
(Dept. Biotechnol., Div. Adv. Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, rRNA, *RRN10*, *RPL40A*

1P-027 出芽酵母の *PKC1* と *GAS1* の 2 重過剰発現による高温・酸ストレス条件下での高効率エタノール生産

○大原 佑介, 荒木 泰治, 則木 奈都子, 笹野 佑, 杉山 峰崇, 原島 俊
(阪大院・工・生命先端・生工)
harashima@bio.eng.osaka-u.ac.jp

本研究では、出芽酵母を用いたバイオエタノール生産の高効率化に向けて重要となる高温及び酸耐性の強化を目指し、過剰発現でそれらのストレスに対して耐性を付与する出芽酵母遺伝子の探索およびエタノール生産への応用について検討した。これまでに、多コピー酵母染色体 DNA 整列ライブラリーから、野生型株の生育限界条件である 41℃ に対して過剰発現で耐性を付与する遺伝子として、細胞壁ストレス応答に関与する *PKC1* を単離した。今回、新たに野生型株の生育限界条件である 0.58% 硫酸添加 (pH2.3) に対して過剰発現で耐性を付与する遺伝子として、*GAS1* を取得した。*GAS1* は、細胞壁の構成要素である β 1,3-グルカンの合成に関与する GPI アンカー型タンパク質をコードしている。*GAS1* 過剰発現株は細胞壁溶解酵素に対して高い耐性を示し、硫酸ストレス条件下で 2 倍程度高い生存率を示した。*PKC1* と *GAS1* の二重過剰発現株を構築し、高温 (39℃)・硫酸 (0.25%, pH3.5) ストレス条件下でのエタノール生産について検討した。その結果、*PKC1* と *GAS1* の二重過剰発現株は野生型株に比べて 2.3 倍のエタノール生産収量を示した。*PKC1* と *GAS1* によるストレス耐性化の機構解析が進めば、高温・硫酸ストレス条件下でのさらなるバイオエタノール生産の高効率化が期待される。

Efficient ethanol production of a *Saccharomyces cerevisiae* strain overexpressing *PKC1* and *GAS1* under high-temperature and acid stressed condition

○Yusuke Ohara, Taiji Araki, Natsuko Noriki, Yu Sasano, Minetaka Sugiyama, Satoshi Harashima
(Dept. Biotechnol., Div. Adv. Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, Thermotolerance, acid tolerance

1P-026 rDNA 転写必須遺伝子 *RRN5* の破壊抑圧変異株を利用した RNA 高含有出芽酵母の分子育種

宇杉 祥吾, Khatun Fahmida, ○狩屋 貴洋, 笹野 佑, 杉山 峰崇, 原島 俊
(阪大院・工・生命先端・生工)
harashima@bio.eng.osaka-u.ac.jp

酵母の RNA は核酸調味料の原料として広く用いられていることから、RNA 高含有の酵母は産業上有用である。本研究では、出芽酵母の全 RNA のうち約 80% を占める rRNA に注目し、rDNA の転写に必須な *RRN5* 遺伝子破壊の抑圧変異を取得することにより、RNA 高含有酵母の育種を目指した。*RRN5* は必須遺伝子であるため、*RRN5* がクローン化された *URA3* マーカーを持つプラスミドを野生型株に導入した後、*TRP1* マーカーを用いてゲノム上の *RRN5* を破壊した。その後、*Δrrn5* 破壊株を 5-FOA 培地で培養し、*RRN5* プラスミドが脱落しても生育が可能となった変異株を探索した。その結果、*RRN5* 遺伝子の破壊抑圧変異株を 9 種 (Sup13, Sup14, Sup15, Sup16, Sup17, Sup18, Sup19, Sup23, Sup24) 単離することができた。遺伝解析の結果、Sup13, Sup14, Sup16, Sup24 が持つ変異は優性変異であり、Sup15 と Sup16 が持つ変異は単一変異であることがわかった。これらの抑圧変異株に野生型 *RRN5* 遺伝子を導入した結果、全ての抑圧変異株において野生型株よりも高い RNA 含量が確認された。特に、Sup18 株の全 RNA 含量は野生型株の約 1.81 倍に増加していた。さらに *RRN5* を導入した Sup18 の 18S rRNA 含量を real-time PCR を用いて測定したところ、野生型株の約 1.21 倍であった。以上の結果より、Sup18 の抑圧変異は rRNA の転写量を増加させることで RNA 含量の増加をもたらしている可能性が示唆された。

Molecular breeding of the yeast with high amount of RNA by exploiting the mutant to suppress the disruption of *RRN5* that is essential to transcription of rDNA

Shogo Usugi, Fahmida Khatun, ○Takahiro Kariya, Yu Sasano, Minetaka Sugiyama, Satoshi Harashima
(Dept. Biotechnol., Div. Adv. Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, rRNA, *RRN5*, Suppressor mutant

1P-028 超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* における RIO ファミリープロテインキナーゼの解析

○秋山 貴志¹, 廣崎 賢², 根岸 瑞美², 折田 和泉¹, 林 宣宏², 中村 聡¹, 今中 忠行³, 福居 俊昭¹
(¹東工大院・生命理工・生物プロセス, ²東工大院・生命理工・分子生命, ³立命館大・理工・化生工)
tfukui@bio.titech.ac.jp

[目的] 真核生物や細菌ではタンパク質のリン酸化/脱リン酸化によるシグナル伝達ネットワークが細胞周期や環境応答などにおける遺伝子発現制御や機能調節に関与している。一方、始原菌ではプロテインキナーゼホモログの数が少なく、単純なタンパク質リン酸化ネットワークが機能していることが推測される。本研究では超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 ゲノムに見出された 3 つの RIO ファミリーセリン/スレオニンキナーゼ (TK0679, TK0801, TK2250) の解析を行った。
[方法・結果] 大腸菌を宿主として発現させ、精製した 3 つの組換え型 RIO キナーゼは α -カゼインに対して Mn^{2+} 依存型リン酸化活性を示した。また推定 ATP 結合部位への変異導入により、TK0679 と TK2250 において活性が消失した。これら不活性型酵素をリガンドとして基質タンパク質の同定を試みる。一方、*T. kodakarensis* $\Delta tk0801$ 株、 $\Delta tk2250$ 株、および二重破壊株について全タンパク質の二次元電気泳動を行ったところ、親株と比較してリボフラビン・ブリン・チアミン合成への関与が推定される遺伝子クラスターの発現産物が顕著に増加しており、TK0801・TK2250 が関わるリン酸化ネットワークによりこれら遺伝子の発現が制御されている可能性が示唆された。

RIO-family protein kinases in hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*

○Takashi AKIYAMA¹, Ken HIROSAKI², Lumi NEGISHI², Izumi ORITA¹, Nobuhiro HAYASHI², Satoshi NAKAMURA¹, Tadayuki IMANAKA³, Toshiaki HUKUI¹
(¹Dept. Bioeng., Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech, ²Dept. Life Sci., Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech, ³Dept. Biosci. Biotechnol., Ritsumeikan Univ)

Key words *Thermococcus kodakarensis*, phosphorylation network, 2D electrophoresis